PATENTS – TRADE MARKS – DESIGNS

OFFICE KIRKPATRICK

ESTABL. 1852
S.A.

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

AVENUE WOLFERS 32
B-1310 LA HULPE
(BRUSSELS) BELGIUM

Le 27 février 1997

Ministère des Affaires Economiques
Office de la Propriété Industrielle
Bruxelles.

INFORMATIQUE
28.-2-1997

491878

N° du mandataire: 0106

Messieurs,

re: Brevet européen No 0491878
du 8 juin 1990.
CHIRON CORPORATION.

La mention de la délivrance de ce brevet européen a été publiée au Bulletin Européen des Brevets du 19 février 1997.

Afin d'assurer la protection en Belgique et conformément à l'article 65 de la Convention de Munich, je vous remets une traduction du fascicule du brevet européen.

J'ai l'honneur de vous signaler qu'un pouvoir général est déjà en votre possession.

Je vous remercie de bien vouloir me confirmer la publication de cette traduction et vous prie d'agréer, Messieurs, l'expression de ma haute considération.

Guy PLUCKER.

GA/PG.v

OFFICE KIRKPATRICK S.A.

OPRI - DIE
27.-2-1997
ENTREE
INGEKOMEN

(11) Numéro de publication européen : **0491878**

(12) **TRADUCTION DU BREVET EUROPEEN** **(B1)**

(21) Numéro de dépôt de la demande de brevet européen : **90917939.2**

(22) Date de dépôt de la demande de brevet européen : **8 juin 1990**

(45) Numéro et date du Bulletin Européen où la mention de la délivrance a été publiée : **08/1997** du **19 février 1997**

---

(54) Titre : **Compositions pour l'inhibition de la formation d'hormones protéiques et emploi de celles-ci.**

---

(73) Titulaire du brevet : **CHIRON CORPORATION**

(51) Int. Cl. **A61K 38/55**

(74) Mandataire: **OFFICE KIRKPATRICK S.A.**
Avenue Wolfers, 32
B-1310 LA HULPE

90917939.2

TITRE : Compositions pour l'inhibition de la formation d'hormones protéiques et emploi de celles ci.

Cette invention se situe dans le domaine de l'immunologie/biochimie et concerne particulièrement le développement de compositions et de procédés pour l'identification d'inhibiteurs de la formation d'hormone de nature protéique, et les utilisations prophylactiques et thérapeutiques de ces inhibiteurs pour le traitement de pathologies associées à des niveaux élevés d'hormones. Plus spécifiquement, l'invention facilite l'identification de composés qui peuvent être utiles pour traiter de nombreuses pathologies, en particulier la septicémie, le SIDA et des maladies auto-immunes et offre donc aux médecins d'autres possibilités de traitement.

Uniquement aux États Unis, 194 000 patients sont touchés par l'infection bactérienne nocosomiale et parmi eux, on compte environ 75 000 décès (Maki, D.G. 1981, Nocosomial Infect., (Dikson, R.E., Ed.) page 183, Yrke Medical Books, U.S.A.). La plupart de ces décès sont attribuables à six principaux bacilles gram-négatif, et ce sont Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Proteus, Klebsiella, Enterobacter et Serratia. Le traitement utilisé lors d'une infection bactérienne est l'administration d'antibiotiques, qui malheureusement ont une efficacité limitée.

La pathologie précise de l'infection bactérienne n'est pas complètement comprise néanmoins, on sait que des endotoxines bactériennes, des lipopolysaccharides (LPS), en sont la cause primaire. Les LPS sont constitués d'au moins trois régions antigéniques importantes, le lipide A, le coeur du polysaccharide et le O-spécifique polysaccharide. Ce dernier est également appelé chaîne O-spécifique ou simplement O-antigène. La région chaîne O-spécifique est une longue chaîne polysaccharidique construite d'unités polysaccharidiques qui se répètent. Le nombre d'unités polysaccharidiques diffère parmi les différentes espèces de bactéries et peuvent varier d'une à autant que six ou sept unités polysaccharidiques. Bien que la chaîne O-spécifique varie entre les différentes bactéries gram négatif, le lipide A et le coeur polysaccharidique sont similaires lorsqu'ils ne sont pas identiques.

Depuis que l'on sait que les LPS jouent un rôle clé dans la septicémie, de nombreuses approches ont été mises en oeuvre pour neutraliser son activité. Actuellement, il y a d'importants

travaux qui suggèrent qu'un anticorps anti-LPS sera très bientôt un additif cliniquement valable à l'antibiothérapie classique.

Le LPS initie une cascade d'événements biochimiques qui, éventuellement, conduit au décès du patient. Il est généralement admis que le deuxième événement, à la suite de l'introduction du LPS, est la production du facteur de nécrose des tumeurs (TNF) comme résultat de la stimulation par le LPS des macrophages. Des efforts considérables ont donc été engagés pour produire des anticorps neutralisantsanti-TNF, ou d'autres molécules capables d'inhiber ses effets septiques. Il est probable qu'un anticorps anti-TNF aura des applications cliniques intéressantes (Tracey et coll., 1987, Nature, 330:662).

Le TNF existe sous deux formes, une forme liée à la membrane et une forme soluble sécrétée (Decker et coll., 1987, J. of Immunol., 138:957 et Kriegler et coll., 1988, Cell, 53:45). Le TNF humain a été cloné et on a montré qu'il s'agit d'un polypeptide de 17 kd auquel s'ajoute une séquence peptide signal, inhabituellement longue, de 76 acides aminés. La molécule de 17 kd joue un rôle clé dans l'initiation de la cascade biochimique responsable de la septicémie. En 1988, Kriegler et coll. (Cell, 53:45) ont avancé l'hypothèse que le TNF peut exister à la fois sous la forme d'une protéine liée à la membrane de 26 kd et à la fois sous une forme soluble correspondant à l'espèce de 17 kd. La forme de 26 kd est le précurseur, ou la prohormone, de la molécules mature de 17 kd. En outre, Kriegler et coll. (voir ci-dessus) émettent l'hypothèse que ces deux formes de TNF peuvent avoir des effets biologiques différents.

Puisque le TNF joue un rôle clé dans le développement d'une septicémie, il apparait tout à fait clair qu'un besoin d'identifier et de développer des agents prophylactiques et/ou thérapeutiques anti-TNF existe. Comme mentionné ci-dessus, l'anticorps anti-TNF semble prometteur et on a montré son efficacité sur des babouins. Cependant, ces études impliquaient l'utilisation de TNF non humain et d'anticorps anti-TNF non humain. D'un point de vue pratique, les applications thérapeutiques de l'anticorps anti-TNF qui n'est pas d'origine humaine sont limitées en raison du rejet immunologique de cet anticorps par le système immunitaire du patient. Par conséquent, on privilégie l'utilisation d'un anticorps humain, ou d'un anticorps crée par des techniques de génie génétique consistant en une région constante humaine et une région variable de souris.

On a montré récemment que le TNF, en plus du rôle clé qu'il joue dans la septicémie, est impliqué dans l'initiation de l'expression du virus de l'immunodéficience humaine dans des cellules humaines porteuses du virus à l'état latent (Folks et coll., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:2365). Par conséquent, prévenir ou inhiber la formation du TNF de 17 kd, ou des formes de plus faible poids moléculaire pourrait être un traitement prophylactique valable pour les patients atteints du SIDA en prévenant l'expression du virus à l'état latent chez le patient.

Le TNF joue également un rôle dans de nombreuses maladies auto-immunes, et en particulier, dans l'arthrite (Duff et coll., 1987, International Conference on Tumor Necrosis Factor

and related cytotoxins, 175:10). Des composés ou des méthodes inhibant l'action du TNF peuvent avoir des applications considérables dans le traitement de nombreuses maladies d'origine immunologique.

En plus de l'anticorps, on a pensé à d'autres molécules ayant une activité inhibitrice sur le TNF. Ces inhibiteurs du TNF, qui ne sont pas des anticorps, sont décrits par Seckinger et coll., 1988, J. of Exp. Med., 167:151, Seckinger et coll, 1989, J. Biol. Chem. 264:11966, et dans la demande de brevet européen No. 88830365.8, inventeurs Wallach et coll.). Les inhibiteurs sont présents dans l'urine de patients fiévreux et ont été purifiés; leurs poids moléculaires s'échelonnent entre environ 27 000 et 33 000. Jusqu'à présent, aucun de ces inhibiteurs n'a une efficacité reconnue dans le traitement de la septicémie.

De la discussion précédente, il apparait clairement qu'il est nécessaire d'identifier et de développer d'autres inhibiteurs anti-TNF, à la fois sur la base d'anticorps et également en employant d'autres stratégies, qui peuvent être utilisés avec efficacité dans le traitement de la septicémie.

Dans sa forme la plus générale, l'invention décrite ici présente des méthodes et des compositions pour inhiber la production de la forme mature d'une hormone protéique, de préférence d'origine immunologique, à partir de son précurseur, la prohormone. Ces compositions sont utiles pour prévenir ou traiter des maladies concernant des patients ayant des taux élevés d'hormones matures circulantes.

Un deuxième objet de l'invention décrite ici concerne un procédé d'identification de molécules qui inhibent la production d'une ou de plusieurs forme(s) mature(s) de TNF. De tels inhibiteurs sont distincts à la fois de l'anticorps anti-TNF qui neutralise le TNF et à la fois de l'anticorps anti-LPS qui se lie et neutralise les effets des LPS.

Un troisième objet de l'invention est une description d'un procédé qui peut être utilisé pour l'identification d'agents prophylactiques et/ou thérapeutiques pour le traitement de la septicémie en partant du principe que ces médicaments interfèrent dans le clivage de la prohormone du TNF de 26 kd par une enzyme, que l'on appelle la convertase, qui clive la molécule de 26 kd et par conséquent produit des molécules de plus faible poids moléculaire induisant la septicémie.

Un quatrième objet de l'invention est une description d'un procédé d'identification d'inhibiteurs de la septicémie qui ont des applications significatives d'ordre prophylactique et/ou thérapeutique en partant du principe que ces inhibiteurs sont capables d'interférer avec la production du TNF mature de 17 kd à partir du précurseur de 26 kd, en agissant sur la convertase qui élimine la séquence peptide signal de 76 acides aminés de la molécule de TNF de 26 kd pour produire le TNF de 17 kd.

Un cinquième objet de l'invention est une présentation d'une classe de composés qui sont à la fois des inhibiteurs de la convertase et sont également efficaces dans la prévention et/ou le traitement de la septicémie. Une liste partielle des composés appartenant à cette classe comprend

des anticorps anti-convertase, des mutéines de la prohormone, et des protéines ou peptides qui entrent en compétition avec la forme de 26 kd du TNF pour la liaison à la convertase.

Un sixième objet de l'invention est une présentation d'agents prophylactiques ou thérapeutiques appropriés qui inhibent l'activité de la convertase et qui sont efficaces dans le traitement de la septicémie et qui possèdent la séquence en acides aminés du TNF correspondant à celle reconnue par la convertase.

Ces objets de l'invention et d'autres qui viendront s'y ajouter apparaitront plus clairement en considérant la description détaillée de l'invention présentée ci-dessous.

La Figure 1, en A, présente la carte de restriction de la séquence d'ADN qui code pour le TNF 26 kd. En B est représenté le profil d'hydropathie du TNF 26 kd et en C les séquences d'ADN et d'acides aminés de la molécule.

La Figure 2 montre la conversion du TNF 26 kd par la convertase du TNF. Les pistes A, B et C représentent des contrôles différents : lysat des cellules TNF 6.8 (A), contrôles de la transcription/traduction de la molécule de 26 kd (B) et de l'incubation (C). Les pistes D, E, et F montrent la conversion du TNF 26 kd provenant de la transcription/traduction en TNF 17 kd de manière prédominante par la convertase présente dans les fractions cytosoliques des cellules HL 60 S-1 non induites (D) et induites (E), ou une fraction du culot C-1 obtenue à partir de cellules induites. G est le blanc.

La Figure 3 montre l'effet des inhibiteurs sur la conversion du TNF 26 kd en ses formes de plus faible poids moléculaire telles que déterminées sur gel d'électrophorèse. En (A), les pistes A, B, C et D représentent respectivement l'immuno-précipitation du lysat cellulaire provenant d'une lignée cellulaire TNF 6.8 transfectée par pFVXM-TNF6 (Kriegler et coll., 1988, Cell 53:45), l'immunoprécipitation du TNF 26 kd transcrit/traduit in vitro, l'effet du (1-((3-((acétyloxyl)-7-méthoxy-8-oxy-8-oxo-5-thio-1-azabicyclo [4.2.0] oct-2-en- 2-yl)carbonyl) morpholine, S,S-dioxide, (6R-cis) sur la conversion du TNF 26 kd et la conversion du TNF 26 kd en absence de (1-((3-((acétyloxyl)-7-méthoxy-8-oxy-8-oxo-5-thio-1-azabicyclo [4.2.0] oct-2-en-2-yl)carbonyl) morpholine, S,S-dioxide, (6R-cis). En (B), les pistes A et B montrent respectivement l'immuno-précipitation du lysat cellulaire provenant d'une lignée cellulaire TNF 6.8 transfectée par PFVXM-TNF6 (Kriegler et coll., 1988, Cell 53:45), l'immunoprécipitation du TNF 26 kd transcrit/traduit in vitro. Les pistes C et D montrent respectivement la conversion du TNF 26 kd en présence et en absence de 3,4-dichloro-isocoumarine. Les pistes E et F montrent respectivement la conversion du TNF 26 kd en présence et en absence d'élastinal.

Pour faciliter la compréhension de la nature et de la portée de l'invention du demandeur, plusieurs définitions concernant différents aspects de l'invention sont présentées ci-dessous.

Cependant, il faut bien noter que ces définitions sont de nature générale et englobent les définitions qui sont bien connues des hommes du métier.

Les termes "prohormone" et hormone "mature" ont les sens suivants. Le terme prohormone s'applique aux protéines, de préférence d'origine immunologique, qui possèdent une séquence peptidique qui est éliminée au cours de la production in vivo de la protéine. La forme "mature" de l'hormone est obtenue quand le peptide est éliminé. Le mode de réalisation privilégié de l'invention fait appel à la prohormone TNF 26 kd comme cela est discuté en détail ci-dessous, protéine qui est clivée de façon primaire pour donner la forme mature de 17 kd. Cependant, d'autres produits de clivage sont également obtenus à partir de la prohormone et la notion d'hormone "mature" s'étend à ces autres produits. Finalement, il est important de noter que ces prohormones, en plus du TNF sont inclues dans la portée de l'invention et sont considérées comme faisant partie de l'invention. Les CSFs et l'IL-1 sont des exemples de prohormones.

La septicémie est définie ici comme une maladie résultant d'infections bactériennes Gram positif ou négatif, la dernière ayant pour cause primaire une endotoxine bactérienne, un lipopolysaccharide (LPS). Elle peut être induite par au moins à six principaux bacilles Gram négatif, et ce sont Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Proteus, Klebsiella, Enterobacter et Serratia. Le TNF est un facteur que l'on peut détecter dans la phase précoce de la maladie et qui contribue à sa progression. La molécule de 17 kd, ou des mutéines plus courtes connues dans le domaine sont les espèces actives primaires.

Tel qu'utilisé ici, le TNF ayant un poids moléculaire d'environ 26 000 kd se réfère au TNF sous sa forme prohormone. On sait que la longueur de la partie peptidique N-terminale de la prohormone varie en fonction de l'espèce dont elle est issue, bien que le segment propeptidique de la molécule soit une séquence hautement conservée. En effet, chez la souris environ 86 % des 79 acides aminés constituant la séquence signal commune de la pro-hormone sont identiques aux 76 acides aminés que comprend la proséquence du TNF humain. Donc, les hommes de l'art pourront facilement discerner qu'en faisant référence par la suite à un TNF de poids moléculaire d'environ 26 000, ceci n'indique pas que cette molécule dérive d'une espèce particulière et que beaucoup d'entre elles ont une séquence signal légèrement modifiée par rapport à la séquence humaine qui est connue dans le domaine.

Le terme "convertase" ou "convertase du TNF" s'applique à une enzyme normalement présente dans le corps, qui est responsable du clivage du TNF 26 kd en une ou plusieurs espèces de plus faible poids moléculaire. La convertase est essentiellement associée à la membrane si bien que la majeure partie de son activité se situe dans le cytosole. Une autre propriété de la convertase est une association primaire avec des cellules qui produisent du TNF.

L'expression "associée à la membrane" telle qu'elle s'applique à la convertase du TNF signifie que la convertase, sous cette forme, est essentiellement insoluble comme cela est indiqué

par la présence de la plupart de l'activité convertase dans un culot obtenu après centrifugation à 30000g.

Un "anticorps recombinant" se réfère à un anticorps dans lequel une portion de chacune des séquences en acides aminés des chaînes lourdes et légères est homologue à une séquence correspondante d'un anticorps obtenu à partir d'une espèce particulière ou appartenant à une classe particulière, tandis que le segment restant des chaînes est homologue à une séquence correspondante d'un autre anticorps. La plupart du temps, dans un anticorps recombinant, la région variable des chaînes lourdes et légères correspond à des régions variables d'anticorps dérivées d'une espèce de mammifère tandis que les régions constantes sont homologues aux séquences d'un anticorps d'une autre espèce.

Dans sa forme la plus générale, la présente invention concerne des procédés et des compositions pour l'indentification d'inhibiteurs de maladies associées à la production d'hormones matures à partir de leur forme prohormone. Le mode de réalisation privilégié d'une prohormone est le TNF 26 kd qui est coupé en des molécules de plus faible poids moléculaire, en particulier, en une molécule ayant un poids moléculaire d'environ 17 000, qui est fortement impliquée dans le développement de la septicémie. Il est donc clair que des inhibiteurs capables d'agir sur la conversion de la forme de 26 kd du TNF sont utiles pour la prévention et le traitement de la septicémie.

Les dosages décrits ici permettent de mesurer la conversion de la prohormone en sa forme hormone mature, le mode de réalisation privilégié étant la conversion enzymatique de la forme moléculaire de 26 kd du TNF en, de préférence, une forme de poids moléculaire 17 000. L'enzyme responsable de la conversion est appelé convertase. L'invention se présente donc aisément en trois parties. La première partie décrit les matériel et méthodes pour la réalisation de la forme moléculaire de 26 kd du TNF. La deuxième partie décrit des dosages pour la détection et l'identification de différents inhibiteurs de la convertase. Enfin, la troisième partie de l'invention présente une description des manières d'utiliser les inhibiteurs pour traiter des patients atteints de septicémie. Ci-après, chacune de ces parties sera traitée de manière indépendante.

Il est fait référence à plusieurs brevets/demandes de brevets et articles scientifiques ci-après. La présente invention s'appuie en partie sur des matériel et méthodes présentés dans ces références, et donc il est prévu que toutes ces références, dans leur totalité sont incorporées par référence.

Il est important de noter et il convient d'insister sur le fait que, pratiquement toute méthode qui permet de mesurer la conversion des espèces de TNF 26 kd peut être utilisée pour identifier des inhibiteurs de TNF. Par conséquent, bien que les systèmes recombinants décrits ci-après permettent d'obtenir d'énormes quantités de molécules 26 kd et donc facilitent les tests des inhibiteurs de TNF, il est clair que des systèmes non recombinants peuvent être également utilisés. Par exemple, on a montré qu'il est possible d'identifier la molécule de 26 kd dans des monocytes stimulés comme cela est décrit par Kriegler et coll., 1988, Cell, 53:45. Une méthode de dosage

appropriée consiste donc à stimuler des monocytes pour produire de la molécule de 26 kd, et ensuite, en présence de convertase, mesurer la disparition de la molécule en des espèces de plus faible poids moléculaire, de préférence, des espèces de poids moléculaire 17000.

En ce qui concerne la conversion de la molécule de 26000, la convertase, comme cela apparaîtra ci-après, coupe la molécule au niveau d'un site interne ou peut être de plusieurs. Le site de coupure principal se trouve dans la séquence de jonction, qui sépare la forme sécrétée du TNF, c'est à dire l'espèce de poids moléculaire 17000, du peptide signal. La séquence à cette jonction est -Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser. La coupure principale se réalise entre l'alanine et la valine puisqu'on sait que l'acide aminé N-terminal de la molécule de poids moléculaire 17 000 est la valine. Plusieurs autres espèces de TNF sont produites par la convertase, et donc ce sont des produits de site de clivage secondaire. Indépendamment du fait que la molécule de 26 000 soit clivée à un ou plusieurs sites, et puisque l'on cherche à identifier des inhibiteurs de la septicémie, ce point particulier est de peu d'intérêt puisque le dosage présenté peut permettre de suivre aussi bien la conversion des espèces de TNF 26 kd que l'apparition de formes de plus faible poids moléculaire.

Le TNF, sous des formes de 26 kd ou de 17 kd, a été cloné et exprimé dans de nombreux systèmes. Par exemple, le clonage du TNF de lapin est décrit dans les brevets européens EP 146 026, publié le 26 Juin 1985 (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) et EP 148 311 publié le 17 Juillet 1985 (Asahi Kasei Kogyo Kabushiki). Le clonage du TNF humain ayant 151 et 155 acides aminés (2 et 6 de moins que la forme native) est décrit dans le brevet européen EP 155 549 publié le 25 Septembre 1985 (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) et le TNF humain de 155 acides aminés est décrit dans le brevet européen EP 158 286 publié le 16 Octobre 1985 (Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha) et correspondant au GB 1 158 829A publié le 20 Novembre 1985. Le clonage de la forme mature du TNF (157 acides aminés) et de nombreuses formes modifiées (mutéines) qui en dérivent est décrit dans le brevet européen EP 168 214, publié le 15 Janvier 1986 (Genentech) et le brevet américain PCT US 85/01921, déposé le 3 Octobre 1985 (Cetus Corporation). Le dernier, PCT 85/01921, correspond au WO 86/02381.

De plus, les brevets américains No. 4 677 063 et 4 677 064 présentent des séquences d'ADNc qui codent pour les formes de 26 000 et de 17 000 du TNF et également pour des mutéines de ces molécules.

La séquence d'ADNc qui code pour des espèces de TNF 26 kd est de préférence obtenue à partir du plasmide pB11 décrit dans WO 86/02381 et les brevets américains Nos. 4 677 063 et 4 677 064. Le plasmide pB11 contient le promoteur de SV40 relié de manière fonctionnelle à la séquence codante du TNF et donc est utile pour l'expression des espèces de TNF 26 kd dans des cellules hôtes eucaryotes. De plus, un second plasmide qui contient la séquence complète qui code pour le TNF 26 kd est décrite dans la demande de brevet et les brevets américains qui précèdent.

Il est désigné par pE4. Le plasmide pE4 est déposé à l'American Type Culture Collection sous le numéro d'adhésion 39894.

La séquence d'ADNc qui code pour le TNF 26 kd dans le plasmide pB11 est un fragment Pst1. De ce fait, elle est facilement excisée et insérée dans chacun des nombreux systèmes d'expression appropriés. De préférence, le système d'expression est le plasmide PFVXM qui est déposé à l'American Type Culture Collection sous le numéro d'accès 67 103.

Le plasmide PFVXM est un vecteur rétoviral qui est dérivé du plasmide pEVX décrit par Kriegler et coll., 1984, dans Cell 48:483). PEVX a un site d'épissage donneur de 3' vers 5' - longue répétition terminale - dérivé du virus des leucémies de la souris Moloney. On a montré précédemment que cette séquence d'épissage (donneur) entraîne une diminution de la quantité de matrices épissées traduites à partir des constructions rétrovirales. Donc, le plasmide PEVX a été manipulé pour éliminer la séquence d'épissage (donneur) et insérer à la place un fragment analogue SmaI du génome viral du sarcome de la souris Harvey qui ne contient pas la séquence d'épissage (donneur) du virus des leucémies de la souris Moloney. Le vecteur qui en résulte, PFVXM ne contient pas la séquence d'épissage (donneur) du virus des leucémies de la souris Moloney et est porteur d'une séquence codant pour les protéines de l'enveloppe du virus. Le plasmide PFVXM a un site Pst I approprié au niveau duquel les séquences d'ADN qui codent pour l'espèce TNF 26 kd peuvent être insérées.

Des sources d'activité convertase sont disponibles chez de nombreux et divers matériaux biologiques. Ceux-ci comprennent des tissus, des cellules, ou des extraits ou des fluides associés à ces derniers, de préférence, mais pas nécessairement, d'origine immunologique. De plus, des lignées cellulaires établies peuvent également être utilisées. Des sources appropriées comprendront des cellules mononucléaires telles que des leucocytes ou des lignées cellulaires d'origine leucocytaire, de préférence la lignée cellulaire HL60. En raison de la facilité à manipuler les lignées cellulaires établies, la source préférée de convertase est la lignée HL60. La conversion de l'espèce TNF 26 kd en espèce 17 kd est donc effectuée en combinant l'espèce 26 kd avec soit les cellules HL60 intactes, soit des extraits qui en dérivent, ou un milieu dans lequel des cellules HL60 ont été cultivées et dans lesquels existe une activité convertase. Pour certains types de cellules, l'activité convertase est présente dans le milieu de culture après une stimulation appropriée qui est discutée en détail ci-après. En outre, il est possible d'obtenir une fraction membranaire que l'on peut utiliser car l'activité convertase est partiellement associée à la membrane.

La procédure pour isoler des monocytes est bien connue dans le domaine, tout comme les autres méthodes de culture de cellules telles que les HL60. Brièvement, des monocytes peuvent être préparés à partir du sang périphérique par centrifugation à travers du Ficoll et du percoll (49.2%) en utilisant les techniques classiques. Ceci fournit une population enrichie en monocytes et lymphocytes, et les monocytes peuvent être en outre enrichis en étalant le mélange de cellules

dans des boites de culture cellulaire et en incubant ces cellules pendant le temps nécessaire pour que les monocytes adhèrent à la surface du plat de culture. Les lymphocytes sont alors éliminés du plat par lavage, laissant seulement les monocytes adhérant au fond du plat. Ces cellules peuvent alors être utilisées telles quelles ou peuvent être stimulées pour produire des niveaux élevés de convertase en utilisant des activateurs connus de monocytes, de préférence des lipopolysaccharides et du phorbol myristate acétate. Les cellules peuvent être fractionnées et, un extrait ou bien une fraction membranaire peut être préparé à partir de ces cellules, et employé dans les dosages décrits ci-dessous.

Des inhibiteurs de l'activité convertase peuvent aussi présenter une action prophylactique ou thérapeutique que l'on peut utiliser dans le traitement de la septicémie. Ils peuvent être identifiés en utilisant les tests suivants et, en outre, comprendre dans le mélange réactif du dosage des composés dont on souhaite tester l'activité inhibitrice. Un test approprié consiste à combiner du TNF 26 kd, la convertase et l'inhibiteur. Les hommes du métiers auront bien sur compris que les substances inhibitrices seront ajoutées à la convertase avant que la convertase ne soit ajoutée au TNF, ou qu'elle peut être ajoutée au TNF avant ou immédiatement après l'addition de la convertase. L'ordre d'addition peut faciliter l'identification des inhibiteurs mais n'est pas déterminante. Si une substance a une activité inhibitrice, on peut le mettre en évidence par une analyse en électrophorèse de la solution qui démontrera une réduction de la quantité de l'espèce 26 kd et simultanément la présence de molécules de TNF de plus faible poids moléculaire.

En plus d'identifier des composés ayant une activité anti-convertase que l'on ne soupçonnait pas, on démontrera que plusieurs composés ont de fortes activités anti-convertase tels que des anticorps anti-convertase, polyclonaux ou monoclonaux, ou des anticorps recombinants, de préférence humanisés. On peut produire un anticorps monoclonal dirigé contre la convertase en utilisant les méthodes générales décrites par Kohler G. et Milstein C. (Kohler G. et Milstein, C., 1975, Nature, 256:495) qui ont été modifiées au cours des années comme le savent les hommes du métier. Ces études initiales impliquaient la fusion de lymphocytes murins avec des plastocytomes qu'il est possible de sélectionner par des drogues pour produire des hybridomes. Ensuite, la technique a été appliquée à la production de lignées cellulaires hybrides capables de sécréter des anticorps monoclonaux humains. Ces dernières méthodes sont décrites de façon générale dans l'article de Abrams, P., 1986, Methods in Enzymology, 121:107, mais d'autres modifications sont connues par les hommes du métier. En ce qui concerne la production d'anticorps murin ou humain, les cellules sécrétant les anticorps sont associées avec un partenaire de fusion et la cellule fusionnée avec un agent de fusion approprié, de préférence le polyéthylène glycol et, mieux encore avec du polyéthylène glycol 1000. Ce dernier est ajouté au culot de cellules contenant les cellules sécrétant les anticorps et le partenaire de fusion en petites quantités sur une courte période de temps en agitant doucement. Après l'addition de l'agent de fusion, le mélange cellulaire est lavé pour éliminer l'agent de fusion et tous les débris cellulaires, et le

mélange cellulaire contenant des cellules fusionnées et des cellules non fusionnées est ensemencé dans des chambres de culture cellulaire appropriées contenant un milieu de croissance sélectif. Après plusieurs semaines, on voit apparaître des cellules hybrides qui peuvent être identifiées par leur production d'anticorps et sous clonées pour assurer la stabilité de la lignée cellulaire hybride.

L'anticorps préféré est un anticorps monoclonal d'origine humaine qui peut être préparé à partir de lymphocytes sensibilisés avec de la convertase soit in vivo soit in vitro par immortalisation des lignées cellulaires hybrides productrices d'anticorps, par conséquent on dispose d'une source permanente des anticorps désirés. Les techniques d'immunisation in vivo sont bien connues dans le domaine tandis que les techniques in vitro sont décrites de façon général par Luben, R. et Molher, M., 1980, Molecular Immunology, 17:635, Reading, C. Methods in Enzymology, 121 (partie 1):18, ou Voss, B., 1986, Methods in Enzymology, 121:27. De nombreux systèmes d'immunisation in vitro sont efficaces pour sensibiliser des cellules B humaines (Reading, C., 1982, J. of Immun. Methods, 53:261).

Il est évident maintenant pour les hommes du métier qu'au lieu d'immuniser des individus directement avec la convertase, des lymphocytes peuvent isolés à partir d'individus sont soumis ou ont été soumis à une infection bactérienne. Une fraction de ces lymphocytes est sensibilisée à la convertase et peut être utilisée pour produire des lignées de cellule hybrides sécrétant des anticorps de façon permanente. Par exemple, des patients humains immunodéficients sont de façon générale sensibles aux infections bactériennes, et en particuliers ceux souffrant d'affections malignes, de brulûres étendues, etc., et des lymphocytes isolés à partir de ces patients peuvent être une source de cellules sécrétant des anticorps.

Des lymphocytes sensibilisés peuvent être immortalisés par transformation virale. La technique de transformation virale appropriée pour des lymphocytes humains implique l'utilisation du virus Epstein-barr. Le virus est capable de transformer des cellules B humaines et a été utilisé pour générer des anticorps monoclonaux humains (Crawford, D. et coll., 1983, J. of General Virology, 64:697, Kozbor, V. et Roder, J., 1983, J. Immun. Today, 4:72).

Une autre méthode où des lymphocytes sensibilisés peuvent être immortalisés consiste à combiner les deux techniques citées plus haut, qui sont la transformation virale et la fusion cellulaire. La combinaison appropriée consiste à transformer des cellules sécrétant des anticorps avec le virus Epstein barr et ensuite à fusionner les cellules transformées à un partenaire de fusion approprié. Le partenaire de fusion peut être une lignée cellulaire de myélome de souris, une lignée cellulaire d'hétéromyélome, ou une lignée cellulaire de myélome humain ou d'autres lignées cellulaires immortalisées (Demande de brevet PCT No. 81/00957, Schlom et coll., 1980, PNAS USA, 77:6841, Croce et coll., 1980, Nature, 288:488). Le partenaire de fusion approprié est un hétéro-hybride souris-humain et mieux encore la lignée cellulaire F3B6. Cette lignée cellulaire est déposée à l'American Type Culture Collection sous le numéro d'adhésion HB8785 (déposée le 18

avril 1985). Les méthodes pour obtenir F3B6 sont décrites dans la demande de brevet européen, numéro de publication 174 204.

Des techniques applicables à l'utilisation de la transformation par le virus Epstein barr et à la production de lignées cellulaires immortelles sécrétant des anticorps sont présentées par Roder, J., et coll., 1986, Methods in Enzymology, 121:140. La procédure consiste à isoler le virus Epstein barr à partir d'une source appropriée, généralement une lignée cellulaire infectée, et à exposer les cellules cibles sécrétant l'anticorps aux surnageants contenant le virus. Les cellules sont lavées et cultivées dans le milieu de culture approprié. Ensuite, les cellules transformées par le virus présentes dans la culture cellulaire sont identifiées par la présence d'antigène nucléaire du virus Epstein barr et les cellules transformées sécrétant les anticorps peuvent être identifiées en utilisant les méthodes standards connues dans le domaine.

Il est maintenant évident pour les hommes du métier que, bien que le mode de réalisation privilégié de la présente invention est un anticorps monoclonal neutralisant anti-convertase, seul ou en combinaison, ces anticorps peuvent être altérés mais conservent toujours une activité biologique. Les anticorps modifiés par réduction à des fragments de différentes tailles tels que $F(ab')_2$, Fab, Fv ou similaires, sont donc compris dans la portée de l'invention. Les lignées cellulaires hybrides qui produisent l'anticorps peuvent être aussi considérées comme une source d'ADN qui code pour l'anticorps désiré, ADN qui peut être isolé et transféré dans des cellules par des techniques de génétique connues pour produire un anticorps par génie génétique. Un exemple illustrant ce dernier cas est la production d'anticorps simple chaîne ayant le site de combinaison de l'anticorps des hybridomes décrits ici. L'anticorps simple chaîne est décrit dans le brevet américain No. 4 704 692. Un deuxième exemple d'anticorps produit par génie génétique est un anticorps recombinant ou chimérique. Des méthodes pour la production d'anticorps recombinant sont décrites dans le brevet américain No. 4 816 567, inventeur Cabilly et coll., la demande de brevet japonais, Numéro de série 84169370, déposée le 15 Août 1984, la demande de brevet britanique 8422238, déposée le 3 Septembre 1984, et la demande de brevet japonais No. 85239543, déposée le 28 Octobre 1985. La demande de brevet britanique, No. 867679, déposée le 27 Mars 1986 décrit des méthodes pour produire un anticorps altéré dans lequel, au moins des parties des régions de détermination de la complémentarité (CDRs) des domaines variables des chaînes légères et lourdes ont été remplacées par des partie analogues des CDRs d'un anticorps d'une autre espèce. En utilisant les méthodes décrites ici, il est possible de construire un anticorps recombinant ayant la région CDR d'une espèce greffée sur un anticorps d'une deuxième espèce qui a une région CDR remplacée. Le mode de réalisation privilégié dans cet exemple est une région CDR d'un anticorps anti-convertase murin qui remplace la région CDR d'un anticorps humain.

En plus des anticorps, il existe des composés qui entrent en compétition avec le TNF 26 kd pour la liaison à la convertase qui inhibent ou réduisent la conversion du TNF 26 kd en sa

forme de 17 kd et donc peuvent être utiles en tant que médicaments pour traiter la septicémie. Une telle classe de réactifs comprend des peptides ou des protéines, ou d'autres composés synthétiques ou d'origine naturelle, qui ont une activité de liaison à la convertase similaire à la forme de 26 kd du TNF. Des peptides ou protéines appropriés de cette classe sont ceux qui possèdent une séquence en acides aminés similaires à celle trouvée à la jonction entre le TNF 26 kd et l'espèce de 17 kd. Cette séquence est Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser ou l'alanine est le résidu présent dans la portion du TNF qui reste dans la membrane après le clivage, et la valine est l'acide aminé N-terminal du TNF 17 kd. Bien que la séquence présentée soit de sept acides aminés, il est important de noter que la séquence minimale est un dipeptide reconnu par la convertase dont la séquence est Ala-Val.

C'est pourquoi la séquence dipeptidique est absolument nécessaire comme partie d'un peptide ou d'une protéine inhibiteur, ces derniers pouvant avoir d'autres acides aminés qui favorisent ou sont parfois requis pour la liaison de la séquence dipeptidique à la convertase et l'inhibition de son activité enzymatique.

Un autre mode de réalisation de l'inhibiteur de convertase peptide/protéine est un peptide ou une protéine qui a une séquence en acides aminés, qui a une fonction similaire : Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala. Ce peptide réunit ensemble les sites de clivage de la convertase et va donc prévenir la formation de la forme 17 kd du TNF et des formes de plus faible poids moléculaire. Le premier, le site de clivage dominant se trouve entre l'alanine et la valine aux positions -1 et +1, et le deuxième site se trouve entre la proline et la valine aux positions +12 et +13. Ces positions correspondent à la séquence en acides aminés présentée en Figure 1.

Une deuxième classe d'inhibiteurs compétitifs est constituée de composés ayant la séquence montrée ci-dessus qui est Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser ou Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala mais dans laquelle des acides aminés ont été mutés ou délétés pour donner un substrat non clivable. Un mode de réalisation privilégié de ce peptide est une mutéine du TNF de 26 kd non clivable produite par des techniques de mutagénèse de site spécifique. La mutéine la plus appropriée est celle dans laquelle l'alanine et/ou la valine est substituée ou délétée.

Les peptides décrits ci-dessus peuvent être réalisés en utilisant des techniques bien connues dans le métier, telles que par exemple, la méthode en phase solide de Merrifield décrite dans Science, 232:341-347 (1985). La méthode permet d'utiliser des synthétiseurs disponibles dans le commerce tels que le synthétiseur automatique de peptide Biosearch 9500, ou le clivage des acides aminés protégés est réalisé en utilisant le fluorure d'hydrogène, et les peptides purifiés par HPLC préparative utilisant un appareil Walters Delta Prep 3000 sur une colonne de 15-20 μm Vydac C4 PrepPAK.

Enfin, il est important de savoir que la spécificité de la convertase est similaire à celles des enzymes telles que l'élastase c'est à dire que ces enzymes clivent de façon prédominante entre des acides aminés dont la charge est neutre tels que la valine, la proline et l'alanine. Donc, en plus des peptides inhibiteurs mentionnées ci-dessus, de nombreux autres inhibiteurs connus pour inhiber l'élastase vont de façon générale inhiber l'enzyme qui clive le TNF. En utilisant le dosage décrit ci-dessous, on peut identifier les composés qui inhibent la convertase. De nombreux inhibiteurs de l'élastase sont disponibles dans le commerce, voir par exemple les catalogues de Boehringer Mannheim Biochemicals, ou sont connus dans le domaine (Doherty et coll., 1986, Nature, 322:192, les brevets américains Nos. 4 711 886, 4 797 396, 4 717 722 et 4 699 904. Les inhibiteurs appropriés de l'élastase sont des antibiotiques modifiés de type céphalosporine tels que ceux montrés par Doherty et coll., voir ci-dessus. Le plus approprié est le (1-((3-((acétyloxyl)-7-méthoxy-8-oxy-8-oxo-5-thio-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-yl)carbonyl)morpholine,S,S-dioxide, (6R-cis). Stetler et coll., 1986, Nucleic Acid Research, 14:7883, décrivent également un clone d'ADNc qui code pour un inhibiteur de l'élastase neutrophile.

La plupart des techniques recombinantes qui sont décrites ici peuvent être utilisées pour transformer des cellules, fabriquer des vecteurs, extraire des ARN messagers et similaires, et sont utilisées en biotechnologie et la plupart des expérimentateurs sont familiers des matériaux et des techniques employés. Cependant, par convenance, le paragraphe suivant rappelle les grandes lignes de ces techniques.

La construction de vecteurs appropriés contenant la séquence désirée codant pour le TNF fait appel à des techniques classiques de ligation et de restriction qui sont bien maîtrisées dans le domaine. Les vecteurs isolés, les séquences d'ADN ou les oligonucléotides sont clivés, manipulés et réinsérés et liés sous la forme désirée.

Le clivage de l'ADN à un site spécifique est réalisé en traitant l'ADN avec des enzymes de restriction appropriées dans des conditions qui sont généralement bien connus dans le domaine, et les particularités de chacune sont spécifiés par fabriquant de ces enzymes disponibles dans le commerce (voir par exemple le catalogue de produits de New England Biolabs). En général, environ 1 μg de plasmide ou d'ADN est clivé par une unité d'enzyme dans environ 20 μl de solution tampon. Dans les exemples décrits ici, typiquement, on utilise l'enzyme de restriction en excès pour assurer la digestion complète du substrat ADN. Des temps d'incubation d'environ une heure à deux heures à 37°C sont appropriés, bien que des variations peuvent être tolérées. Après chaque incubation, les protéines sont éliminées par extraction au phénol/chloroforme et peut être suivie d'une extraction à l'éther, et l'acide nucléique est récupéré dans les fractions aqueuses par précipitation à l'éthanol suivie par une chromatographie sur colonne Séphadex G-50. Si désiré, la séparation en fonction de la taille des fragments de clivage peut être réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou d'agarose en utilisant les techniques classiques. Une description

générale des séparations selon la taille est données dans Methods in Enzymology, 1980, 65:499-560.

Les extrémités des fragments clivés par enzyme de restriction peuvent être modifiées pour devenir des extrémités franches par traitement avec le grand fragment de l'ADN polymérase I d'E. coli, c'est à dire le fragment Klenow, en présence des quatres désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) en utilisant des temps d'incubation d'environ 15 à 25 minutes à 20-25°C dans du Tris pH 7,6 50 mM, NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 6 mM, DTT 6 mM et dNTPs 10 mM. Après le traitement avec l'enzyme de Klenow, on fait une extraction phénol/chloroforme et une précipitation à l'éthanol du mélange. Un traitement dans les conditions appropriées par la nucléase S_1 a pour résultat d'hydrolyser les portions d'ADN simple brin.

Les ligations sont réalisées dans des volumes de 15 à 30 µl dans les conditions standards et de température suivantes : Tris-Cl pH 7,5 20 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DDT 10 mM, BSA 33 µg/ml, NaCl 10-50 mM, ATP 1 mM et 0,3-0,6 (Weiss) unités d'ADN T4 ligase à 4°C pour les ligations des extrémités collantes ou pour les ligations des extrémités à bout franc. Les ligations intermoléculaires des extrémités collantes sont en général réalisées en utilisant une concentration d'ADN total de 33-100 µg/ml. Pour les ligations des extrémités à bout franc, on utilise une concentration totale d'ADN des extrémités d'environ 1 µM.

Dans la construction des vecteurs employant des "fragments de vecteur", le fragment de vecteur est habituellement traité avec la phosphatase alcaline bactérienne (*baterial alkaline phosphatase*, BAP) afin d'éliminer le phosphate en 5' et de prévenir la religation du vecteur. Les digestions par la BAP sont conduites à pH 8 dans du Tris environ 150 mM en présence de Na^+ et de Mg^{++} en utilisant environ 1 unité de BAP par µg de vecteur à 60°C pendant environ une heure. Les fragment d'acide nucléique sont récupérés par l'extraction de la préparation au phénol/chloroforme, suivi d'une précipitation à l'éthanol. On peut également prévenir la religation dans les vecteurs en les soumettant à une double digestion par une digestion supplémentaire des fragments non désirés.

Dans les constructions exposées ci-dessous, on vérifie que les ligations sont correctes en transformant dans un premier temps la souche appropriée d'E. coli avec le mélange de ligation. Les transformants sont sélectionnés par le test de la résistance à l'ampicilline, la tétracycline ou d'autres antibiotiques, ou en utilisant d'autres marqueurs en fonction du mode de construction du plasmide, tel que cela est connu dans le domaine. Des minipréparations d'ADN peuvent être préparées à partir des transformants par la méthode de Ish-Howowicz D. et coll., 1981, Nucleic Acids Res., 9:2989 et l'ADN analysé par restriction et/ou séquençage par la méthode didésoxy de Sanger et coll., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74:5463 comme cela est décrit en outre par Messing et coll., 1981, Nucleic Acids Res., 9:309, ou par la méthode de Maxam et coll., 1980, Methods in Enzymology, 65:499.

Des souches hôtes utilisées pour le clonage dans M13 sont des souches d'E. coli susceptibles d'être infectées par des phages, par exemple des souches DG98 de E. coli K12 sont employées. La souche DG98 a été déposée à l'ATCC le 13 Juillet 1984 sous le numéro d'accès 1965.

En fonction de la cellule hôte utilisée, la transformation est réalisée en utilisant les techniques standards appropriées pour chacune des cellules. Le traitement au calcium utilisant le chlorure de calcium, tel que décrit par S. N. Cohen, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 68:2110 ou la méthode au $RbCl_2$ décrite par Maniatis et coll., 1984, Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, p. 254, peut être utilisée pour les procaryotes. La transfection peut aussi être réalisée en utilisant la technique de la précipitation au phosphate de calcium de Graham, F. L. et coll., 1973 Virology 52:456 ou Wigler et coll., 1978, Cell 14:725.

Des oligonucléotides synthétiques sont préparés par la méthode triester de Matteucci et coll., 1981, J. Am. Chem. Soc. 103:3185 ou en utilisant des synthétiseurs automatiques disponibles dans le commerce. Le traitement par une kinase des simples brins avant l'appariement ou pour les marquer est réalisé en utilisant de la kinase en excès, par exemple approximativement 10 unités de polynucléotide kinase pour 0,1 nmoles de substrat en présence de Tris (pH 7,6) 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DDT 5 mM , ATP 1-2 mM, 1,7 pmoles de gamma ^{32}P-ATP (2,9 mCi/mmole), spermidine 0,1 mM et EDTA 0,1 mM.

La mutagénèse peut être conduite en utilisant chacune des nombreuses méthodes connues dans le domaine. Ces techniques sont décrites par Smith, 1985, Annual Review f Genetics, 19:423, et des modifications de ces techniques sont décrites dans Methods in Enzymology, 154, partie E, (eds,) Wu et Grossman (1987), chapitre 17, 18, 19 et 20. La méthode appropriée est une modification de la méthode de mutagénèse dirigée dite du "duplex contenant des brèches" (*gapped duplex*). La procédure générale est décrite par Kramer et coll. dans le chapitre 17 du Methods in Enzymology cité ci-dessus.

Les méthodes classiques de mutagénèse M13 impliquent l'appariement d'une petit oligonucléotide synthétique à un ADN M13 simple brin ayant une séquence codante de la cible clonée où l'on souhaite créer une mutation. L'oligonucléotide est presque mais pas entièrement complémentaire de la séquence cible et a au moins un nucléotide mésapparié. Après la réaction d'appariement, la portion qui reste sous forme d'un simple brin d'ADN doit être complétée pour former un hétéroduplex qui peut être transfecté dans une cellules hôte appropriée qui permet l'expression de la mutation. Dans la méthode du "duplex contenant des brèches", un duplex d'ADN partiel est construit et a seulement la région cible exposée à l'instar des méthodes conventionnelles où la région cible et le reste de l'ADN M13 simple brin sont exposés. Comme dans les méthodes conventionnelles, un petit oligonucléotide est apparié à la région cible et allongés et liés pour former un hétéroduplex. Cependant, en raison de la petite portion unique d'ADN simple brin disponible pour l'hybridation dans la méthode du duplex contenant des

brèches, l'oligonucléotide ne se lie pas sur des sites non désirés appartenant au génome M13. En outre, cette méthode a l'avantage supplémentaire d'introduire très peu d'erreur pendant la formation de l'hétéroduplex puisque seulement une très petite zone d'ADN de chaque coté de la région cible doit être complétée.

Plus spécifiquement, la méthode du duplex contenant des brèches implique de cloner la séquence cible d'ADN dans un phage M13 approprié qui porte des marqueurs de sélection tels que la mutation ambre du codon stop. Ce dernier permet une sélection négative dans une cellule hôte qui ne peut pas supprimer les effets de la mutation. De préférence, le phage est M13mp9 qui contient deux codons ambre dans des gènes critiques du phage. Donc, la séquence qui code pour le TNF 26 kd est clonée dans M13mp9 ambre+ et l'ADN simple brin est préparé à partir du phage selon les techniques classiques. Ensuite, l'ADN double brin répliqué provenant de M13 GAP, un dérivé M13 manipulé génétiquement à qui il manque les codon ambres, est clivé avec l'enzyme de restriction Hinc II. La séquence de base de M13 GAP est similaire à celle de M13mp18 à qui il manque à la fois les codons ambre et la séquence entre les paires de bases 6172 et 6323. Cette délétion jouxte les sites de clonage multiple des séries M13mp et génère un site de clivage unique Hinc II. L'ADN "duplex contenant des brèches" est formé en utilisant des techniques d'hybridation ADN/ADN standards constitué d'un ADN simple brin ayant les codons ambre et d'un second brin d'ADN provenant de la digestion par Hinc II du M13 GAP à qui il manque à la fois les codons ambre et les séquences codantes du TNF. Donc, la seule portion du duplex contenant des brèches qui est exposée est la séquence cible du TF 26 kd. Le nucléotide désiré est apparié à l'ADN "duplex contenant des brèches" et tous les "trous" sont comblés avec l'ADN polymérase et les ruptures jointes avec l'ADN ligase pour produire un hétéroduplexe. Ce dernier est transfecté, de préférence dans un hôte déficient en système de réparation des mésappariements et un mélange de phages est produit. A partir de cette population hétérogène de phages, un phage porteur de l'ADN non muté du TNF 26 kd qui possède aussi les mutations ambre peut être sélectionné en infectant des cellules hôtes incapables de réparer la mutation ambre par la population hétérogène de phages. Les clones sont ensuite criblés pour détecter les phages porteurs de la mutation désiré du TNF.

Des composés identifiés comme ayant une activité inhibitrice de la convertase auront des applications prophylactiques ou thérapeutiques dans le traitement de la septicémie. Parce que la phase initiale de la septicémie est associée avec une augmentation du TNF circulant, ces inhibiteurs peuvent être utilisés de manière prophylactique dans les cas ou il y a un risque d'infection bactérienne, en particulier dans la préparation pré opératoire. De façon similaire, dans les cas ou un diagnostic précoce de septicémie est posé, les inhibiteurs auront un effet bénéfique en réduisant considérablement la quantité de TNF produit.

Une deuxième application médicale des inhibiteurs de convertase concerne le traitement du SIDA. On a montré que le TNF provoque l'activation de virus de l'immnodéficience humain

latent (Folks et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86, p. 2365 (1989)). Prévenir ou inhiber la formation des formes de TNF de 17 kd ou de plus faible poids moléculaire par inhibition de la convertase serait donc un traitement prophylactique valable du SIDA et serait de préférence utile pour traiter les patient qui sont infectés avec un virus à l'état latent.

Les demandeurs ayant décrit de façon générale leur propre vision de l'invention, les exemples qui sont présentés ci-dessous sont des illustrations de la portée de l'invention. Il est évident pour les hommes du métier que ces exemples ne viennent pas limiter l'invention aux matériel et méthodes présentés puisqu'il existe de nombreuses substitutions possibles qui peuvent être faites sans se départir de la portée de l'invention.

Exemple 1

Conversion du TNF 26 kd

Le vecteur pFVXM déposé à l'American Type Culture Collection sous le numéro d'accès No. 67 103 est utilisé pour produire un vecteur pFVXM-TNF6 qui contient la séquence d'ADN qui code pour l'espèce TNF 26 kd. Pour produire ce dernier vecteur, le plasmide B11 qui contient la séquence d'ADNc qui code pour l'espèce TNF 26 kd a été traité avec Pst I pour exciser la séquence codante. Le fragment est purifié en utilisant des techniques classiques d'électrophorèse. Ensuite, le vecteur pFVXM est traité avec Pst I et le fragment Pst I de pB11 contenant la séquence codante de 26 kd est insérée dans une région à site multiple d'insertion du vecteur en utilisant des techniques classiques comme cela est décrit ci-dessus pour produire le vecteur pFVX-TNF6. Le vecteur pFVX-TNF6 est utilisé pour produire la lignée cellulaire TNF 6,8 comme décrit par Kriegler et coll. (1988), voir plus haut, ou comme décrit dans la demande de brevet américain "Anticorps bloquant un site de clivage dirigé contre des protéines prohormones et utilisations qui en dérivent" déposée le même jour que la présente demande de brevet. Cette demande est Cetus Case No. 2534, inventeurs Kriegler et Perez.

La lignée cellulaire TNF 6,8 exprime à la fois le TNF 26 kd et le TNF 17 kd. La Figure 2 montre la conversion du TNF 26 kd par l'activité de la convertase présent dans les cellules HL 60. La production du TNF 26 kd marqué par une transcription/traduction in vivo et l'analyse par gel d'électrophorèse est décrite ci-dessous, dans l'exemple 2. Noter que les fractions cytosoliques S-1 ou les culots provoquent un conversion presque complète du TNF 26 kd en TNF 17 kd. La Figure montre également, pour des raisons de comparaison, le TNF 26 kd et le 17 kd dans un lysat des cellules TNF 6,8.

Le vecteur pFVXM et le plasmide pB11 sont tous les deux amplifiés dans une souche d'E. coli HB 101. La ligation des fragments est conduite selon les techniques classiques. Le plasmide d'ADN est isolé après ligation et la bonne orientation des séquences codant pour le TNF est contrôlée par une analyse de restriction.

Le plasmide d'ADN est préparé selon la méthode de Birnboim et Doly comme cela est décrit dans Nucleic Acid Research, 7:1513 (1979). Le plasmide d'ADN est passé deux fois sur chlorure de césium, et la bande récupérée est dialysée contre un tampon TE contenant du Tris 10 mM pH 8.0 et EDTA 1 mM.

Exemple 2

Test de la convertase

A. Test de la transcription/traduction in vitro

La méthode de test approprié consiste à faire une transcription/traduction in vitro de la molécule de 26 kd suivie par un traitement avec la convertase en présence et en absence des composés que l'on veut tester pour leur activité inhibitrice sur la convertase. La méthode nécessite la transcription/traduction in vitro de la molécule de 26 kd dont la séquence est présente dans le plasmide B11. Cette séquence est dont excisée de pB11 par digestion à la Pst I et insérée au site Pst I de pGEM-3 (obtenu chez Promega Biotec). Le plasmide obtenu, appelé pGEM-TNF14 est amplifié dans E. coli selon des techniques bien établies et le plasmide d'ADN est préparé selon les techniques de Birnboim et Doly décrites plus haut. La plasmide d'ADN est transcrit in vitro : il est linéarisé par Hind III, et les matrices de plasmides linéarisés sont modifiées par la T7 ARN polymérase pour en faire des transcrits possédant une coiffe et le kit de transcription in vitro de chez Promega Biotec est utilisé. La transcription est réalisée en utilisant les techniques classiques telles que suggérées dans le manuel d'utilisation du fabricant.

L'ARNm est traduit in vivo en présence de ^{35}S-cystéine pour produire du TNF 26 kd marqué à la ^{35}S-cystéine. La méthode consiste à utiliser le kit de traduction (lysat de réticulocyte de lapin) de chez Promega Biotec en suivant les recommandations du fabricant.

Le TNF 26 kd marqué à la ^{35}S-cystéine est utilisé pour tester les inhibiteurs de la convertase comme suit. On mélange 25 μl de matériel traduit in vitro avec 250 μl de HL60 non induite pour l'activité convertase, plus des composés dont on souhaite tester l'activité inhibitrice. La convertase est produite en récoltant des cellules HL 60 à une densité de 2 x 10^9 dont les fractions S-1 (18 ml) et P-30 (6 ml) sont isolées. On utilise 250 μl de la fraction P-30, mais on peut également utiliser la fraction S-1. Le dosage est effectué à 30°C pendant une heure, essentiellement comme cela est décrit plus haut. Ensuite, le mélange est immunoprécipité avec un antisera polyclonal anti TNF et de la protéine A sépharose, culotté et lavé. La fraction de protéine liée est éluée et passée sur électrophorèse. Le gel est séché et exposé à un film radiographique et ensuite développé. Les profiles d'électrophorèse du TNF 26 kd traité avec des dilutions différentes de convertase HL60 mettent en évidence les composés qui possèdent une activité inhibitrice.

En utilisant le test décrit ci-dessus, on a pu démontré que le 3,4-dichloro-isocoumarine et l'élastinal respectivement à des concentrations de 100 μg/ml et 5 mg/ml inhibent la convertase.

On a montré également que le (1-((3-((acétyloxyl)-7-méthoxy-8-oxy-8-oxo-5-thio-1-azabicyclo [4.2.0] oct-2-en- 2-yl)carbonyl) morpholine, S,S-dioxide, (6R-cis) inhibe la convertase à une concentration de 1 mM. Ces résultats sont présentés à la Figure 3.

B. Test du monocyte

En plus de produire le TNF 26 kd par le test de transcription/traduction in vitro décrit ci-dessus, des monocytes stimulés qui produisent du TNF 26 kd (Kriegler et coll., 1988, Cell, 53:45) peuvent être utilisés comme source de la molécule.

Une méthode appropriée employée pour effectuer le test est de stimuler des monocytes et ensuite en présence de convertase de mesurer la disparition du TNF 26 kd et l'apparition d'espèce de poids moléculaire plus faible, de préférence du TNF 17 kd.

Brièvement, des monocytes humains sont purifiés à partir de sang humain par centrifugation, la préparation est ensuite enrichie en utilisant les propriétés d'adhérence des monocytes aux fonds des boites de culture cellulaire. La centrifugation consiste à purifier les monocytes à travers des plaques de Ficoll et percoll (49,2%), disponible chez Pharmacia. Les recommandations du fabricant sont suivies. Le mélange de cellules obtenu après l'étape de centrifugation, un mélange de monocytes et de lymphocytes, est étalé dans des boites de culture de tissu contenant du milieu RPMI supplémenté avec 20% de sérum de veau foetal. Les boites sont mises en incubateur à 37°C pendant 30 minutes après avoir été rincées abondamment avec le même milieu. Ce traitement élimine les lymphocytes non collés et laisse en place seulement les monocytes collés dans le fond de la boite.

Le TNF 26 kd des monocytes est marqué comme suit. Les monocytes sont incubés pendant trois heures à 37°C dans du milieu RPMI supplémenté avec 20% de sérum de veau foetal, 100 ng/ml de lypopolysaccharide et 10 μg/ml de phorbol myristate acétate pendant 30 minutes à 37°C. Ces deux derniers composés induisent l'expression du TNF. Le milieu RPMI est carencé en cystéine et le sérum de veau foetal est présent à la concentration finale de 5%. Le sérum est dialysé avant usage pour éliminer toute trace de cystéine. Après une période de 30 minutes d'incubation, on ajoute 100 μCi de ^{35}S-cystéine et les cellules sont cultivées en présence du radiomarqueur pendant 3 jours à 37°C, après quoi elles sont lysées et utilisées pour tester l'activité convertase. Les étapes pour mener à bien ce test et également pour identifier les inhibiteurs de convertase sont similaires à ceux décrits ci-dessus.

Exemple 3

Mutéine TNF/Anticorps/Peptide inhibiteur de l'activité de la convertase

Les composés suivants ont une activité inhibitrice sur la convertase et peuvent être préparés comme suit et testé pour leur activité inhibitrice comme cela est décrit ci-dessus.

A. Anticorps anti convertase

Un anticorps qu'il soit polyclonal ou monoclonal est préparé de façon à neutraliser l'activité enzymatique de la convertase ou à se lier à la convertase et par conséquent provoquer un encombrement stérique qui empêche la convertase de se lier au TNF 26 kd. La méthode consiste à immuniser un animal hôte approprié avec une fraction membranaire de cellules HL 60 produisant de la convertase. Une quantité suffisante de matériel doit être utilisé pour initier une réponse immnunitaire et habituellement on utilise une quantité comprise entre 10 μg et 10 mg par kilogramme de poids corporel. L'immunisation peut être effectuée à l'aide d'un adjuvant dans un tampon biologiquement acceptable, tampons qui sont connus dans le domaine. La meilleure voie d'immunisation est déterminée expérimentalement et l'immunisation primaire peut être suivie par une ou plusieurs immunisation secondaire en fonction de l'importance de la réponse immunitaire lors de l'immunisation initiale. La présence de l'anticorps neutralisant anti convertase dans le sera est détectée en utilisant le test de la convertase décrit plus haut dans lequel un antiséra est présent dans le mélange du test. L'inhibition de la conversion du TNF 26 kd en espèces de plus faible poids moléculaire indique la présence d'anticorps neutralisant. On assume bien entendu que des contrôles appropriés ont été réalisés afin de s'assurer que l'antiséra provenant d'animaux non immunisés n'a pas d'activité inhibitrice. Les anticorps polyclonaux peuvent être purifiés comme cela est décrit ci-dessous.

(i) Anticorps murins

Pour l'immunisation in vivo des souris, on peut suivre la méthode de Kohler et Milstein décrite dans Nature 256:495 (1975) ou les méthodes modifiées telles que celles décrites par Fendly et coll., 1987, Hybridoma 6:359 et Buck et coll., 1988, In vitro, 18:377. Les techniques in vitro sont décrites de façon générale par Luben R. et Mohler M., 1980, Molecular Immunology, 17:635, Reading, C. Methods in Enzymology, 121 (première partie):18, ou Voss B., 1986, Methods in Enzymology, 121:27.

Les souris sont immunisées avec une fraction membranaire des cellules HL 60 à une concentration de 1 mg/ml; on a montré auparavant que ces fractions sont positives pour l'activité convertase. L'immunisation est réalisée avec un adjuvant de Freund complet. Deux immunisations supplémentaires, ou rappels, sont réalisées à intervalles mensuels sans adjuvant, et un mois après le dernier rappel, on fait aux souris un rappel I.V. avec 10 μg de matériel membranaire. Trois jours après le rappel I.V., les souris sont sacrifiées et leur rate prélevée, et les lymphocytes isolés et fusionnées avec un partenaire, une lignée cellulaire de myélome immortalisée sélectionnable par des drogues. Nombreuses sont les lignées de myélomes qui sont connues dans le domaine, la plupart d'entre elle sont incapables de pousser dans milieu de culture cellulaire HAT supplémentée. Une lignée cellulaire de myélome typique est par exemple SP-2/OAg14. Les hybridomes sont donc formés en combinant les lymphocytes et les cellules de myélome dans un rapport 5:1, en général

2 x 10^6 de cellules de myélome pour 1 x 10^7 lymphocytes. Le mélange cellulaire est culotté, le milieu éliminé et la fusion effectuée par l'ajout de 1 ml de solution de polyéthylène glycol 1500 à 40% (v/v) par addition au goutte à goutte pendant 60 secondes à la température de la pièce, suivi par une incubation 60 secondes à 37°C. On ajoute à la suspension cellulaire sous agitation douce 9 ml de milieu Eagles modifié de Dulbecco pendant 5 minutes. Les agrégats cellulaires dans le mélange sont remis en suspension doucement, les cellules sont lavés et débarrassées du PEG résiduel et étalées dans des plaques à microtitration à une densité d'environ 2 x 10^5 cellules/puits dans du DMEM supplémenté avec du sérum de veau foetal. Après 24 heures, on fournit comme nutriment aux cellules un milieu sélectif double contenant une solution d'hypoxanthine et d'azasérine.

Les milieux des puits où les cellules poussent, test positif, sont testés pour détecter la présence d'un anticorps monoclonal anti convertase. Le test approprié est le test de la convertase décrit dans l'exemple 2, plus haut, dans lequel le milieu à tester pour la présence d'anticorps est présent dans le test. Le meilleur protocole est de combiner des surnageants de 3-8 puits de la plaque et de tester le mélange. Si le mélange est positif, alors le milieu de chaque puits est testé indépendamment pour identifier l'hybridome sécréteur. De nombreux tests sont connus dans le domaine et sont capables de détecter des antigènes solubles ou non solubles comme cela est décrit par Langone J. et Van Vinakis H., Methods in Enzymology, 92 Partie E (1983).

Quelque soit la nature de l'anticorps, monoclonal ou polyclonal, il est souhaitable de purifier l'anticorps par des techniques classiques qui sont connues dans le domaine ou décrites par Springer, 1980, Monoclonal Antibodies,:194, (Eds. Kennett, T. McKearn et K. Bechtol, Plenum Press, New York). Habituellement, on utilise au moins une précipitation de l'anticorps au sulfate d'ammonium utilisant une solution de sulfate d'ammonium à 50%. On peut également utiliser des colonnes d'affinité.

(ii) Anticorps monoclonal humain

Des lymphocytes du sang périphérique sont isolés à partir de patient atteints de septicémie et ensuite infectés avec le virus d'Epstein barr et les lymphocytes immortalisés par fusion avec une lignée cellulaire de myélome sélectionnable et les cellules hybrides ainsi créées sont isolées et caractérisées par leur production d'anticorps.

Plus spécifiquement, des cellules mononucléaires sont séparées sur plaque de Ficoll (Ficoll-hypaque, Pharmacia) et des monocytes isolés du mélange en fonction de leur propriété d'adhérence au plastique. Des méthodes classiques sont utilisées pour effectuer ce protocole. Ensuite, les cellules non adhérentes sont enrichies en producteur d'anticorps par un "lavage avec un antigène spécifique" (panning). Ce lavage est une technique connue dans le domaine et implique l'incubation de la population de cellules sécrétrices d'anticorps avec l'antigène approprié fixé sur une surface de plastique. Les cellules qui expriment un anticorps à leur surface lient l'antigène,

par conséquent adhèrent à la surface de plastique alors que les cellules qui n'expriment pas d'anticorps à la surface n'adhèrent pas et sont donc éliminées au lavage. On enrichie donc la préparation en cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques par cette technique.

Plus spécifiquement, des boites à 6 puits (Costar) sont recouvertes avec une fraction membranaire contenant la convertase préparée à partir de cellules HL 60 soit induites soit non induites comme décrit plus haut; 150 μg de fraction membranaire sont déposés par puits dans une solution saline tamponnée au phosphate et laissés à 4°C toute la nuit. Les puits sont protégés après l'incubation de la nuit avec une solution saline tamponnée au phosphate contenant de l'albumine sérique de boeuf pendant au moins une heure à 4°C, et ensuite lavés avec la solution saline tamponnée au phosphate contenant la BSA. Ensuite, on ajoute 1 ml de PBS/BSA contenant 10^7 lymphocytes dans chaque puits des plaques de six puits. On laissent les lymphocytes en incubation pendant 70 minutes, et à la fin de cette période, toutes les cellules non adhérentes sont éliminées par aspiration. Les cellules adhérentes sont incubées dans un milieu de culture cellulaire (IMDM, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) contenant du sérum de veau foetal à 10%.

Les cellules adhérentes sont soumises à une transformation par le virus Epstein barr en ajoutant dans leur milieu de culture une quantité équivalente de milieu de culture dans lequel des cellules de la lignée cellulaire de ouistiti infectées par le virus Epstein barr (B95-8) ont poussé, et donc contiennent le virus. Les cellules sont cultivées dans ce milieu à 37°C pendant trois heures et de cette façon, les lymphocytes dans la population de cellules adhérentes sont soumis à une infection par le virus Epstein barr. Après cette période d'infection, les cellules sont lavées et ensemencées dans des boites de microtitration à 96 puits à une densité d'environ 1^4-10^5 cellules/puits dans du milieu IMDM, plus 10% de sérum de veau foetal et 30% de milieu conditionné. Ce dernier est dérivé d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde, de préférence JW5. Le milieu contient aussi du 2-mercaptoéthanol 5.10^{-5} M, du sulfate de gentamycine (Sigma) 50 μg/ml et de la cyclosporine A 600 ng/ml (Sandimmun, Sandoz, Basel, Switzerland).

Après environ 14 à 21 jours d'incubation, les surnageants de culture cellulaire sont réunis et criblés pour tester une activité neutralisante de la convertase comme décrit ci-dessus. Les hybridomes sont alors cultivés à faible densité, retestés pour un anticorps neutralisant et cultivés à nouveau et fusionnés avec la lignée cellulaire F3B6 en utilisant du polyéthylène glycol et la technique de fusion sur plaque, techniques bien connues dans le domaine. Cette dernière technique est décrite par Larrick J.W., (1985) dans Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies, E.G. Engleman, S.K.H. Foung, J.W., Larrick, et A.A Raubitschek, Editeurs, Plenum Press, New York, page 446. F3B6 est une lignée cellulaire d'un hétéromyélome qui peut être sélectionné dans un milieu contenant de l'hypoxanthine 100 μM, de l'azasérine 5 μg/ml et de l'ouabaïne 5 μM. Enfin, les hybrides obtenus sont criblés pour s'assurer qu'ils produisent un anticorps neutralisant anti-convertase.

B. Mutéines de 26 kd non clivables

Les mutéines TNF 26 kd qui sont décrites entrent en compétition avec la liaison à la convertase et donc inhibent ou réduisent son activité. Les mutéines dont le mode de réalisation est privilégié sont celles ayant une valine en position 1 et/ou 13, ou une alanine en position -1 et/ou une proline en position 12 substituée ou délétée. Les mutéines sont construites en utilisant une modification de la méthode de mutagénèse de site dirigée sur "duplex contenant des brèches" (*gapped duplex*).

Les tampons/solutions suivants sont utilisés pour réaliser les protocoles désirés : "Tampon du duplex contenant des brèches" 5x (GDB) contenant du KCl 0,938 M et du Tris (pH 7,5) 0,063 M; PEL 10x contenant du KCl 1 M, Tris 0,3 M, $MgCl_2$ 0,15 M, DTT 0,02 M (pH 7,5); KB 10x contenant du Tris 0,5 M, $MgCl_2$ 0,1 M, DTT 0,05 M, EDTA 0,001 M (pH 8,0); une solution fraîche contenant 0,25 mM de dCTP, dATP, dGTP, dTTP faite à partir de solution mère à 10 mM; une solution d'ATP de concentration 0,1 M d'ATP faite en dissolvant 60 mg d'ATP dans 0,8 ml d'H_2O et en ajustant le pH à 7,0 avec du NAOH 0,1 M et le volume final à 1.0 ml avec de l'eau; PEG 20%/NaCl 2.5M; NaOAc 3,0 M; et du TE saturé en phénol.

De nombreuse souches bactériennes et phages sont employés pour produire les mutéines désirées et ce sont : BMH 71-18, JM103, souches pour multiplier des phages; HB2154: MutL, Su-, compétente pour la transformation d'ADN; et HB2151: Su-, utilisée comme cellules formant un tapis de surface (lawn) pendant la transformation; M13 GAP, le RF est utilisé pour la formation du "duplex contenant des brèches"; et le M13mp19amber, l'ADN cible du TNF 26 kd est cloné dans ce vecteur et l'ADN simple brin isolé pour la formation du "duplex contenant des brèches".

Les phages sont introduits dans la souche bactérienne appropriée, multipliés et titrés comme suit. Pour faire une grande quantité soit de phage pour l'ADNss ou de cellules pour l'ADNds, ou l'ADN RF, on utilise le même protocole d'infection.

Un phage purifié sur plaque est produit en utilisant les techniques classiques. Brièvement, des plaques d'agar sont griffées avec des surnageants de phages, puis on dépose doucement une couche constituée de 4 ml d'agar doux et de 100 ml de culture fraîche de la nuit de BMH-71-18. Ensuite, des plaques isolées sont ensemencées et incubées avec une dilution de 1:50 de culture fraîche de la nuit de BMH71-18 dans du R26 ou R27 + 10 mm de $MgCl_2$ et agité à 37°C pendant 4,5-6 heures. R17 (milieu de culture N-Z amine) contient 10 g de N-Z amine type A, 5 g de NaCl dans un volume final d'un litre complété avec de l'eau alors que R26 contient 8 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl dans un volume final d'un litre complété avec de l'eau (milieu de culture YT). La solution de phage est titrée et les bactéries infectées par les phages à une multiplicité d'infection (MOI) de 10. Après incubation de la culture à 37°C sous agitation pendant 4 heures, la suspension cellulaire est centrifugée et le surnageant récupéré pour isoler l'ADNss et

les cellules pour isoler l'ADN RF. L'ADN RF est isolé en utilisant les technique classiques d'isolation de l'ADN plasmidique alors que l'ADNss est isolé comme suit.

Le surnageant de phage (250 ml) est secoué fortement en tournant, puis 200 ml du surnageant est décanté, puis on ajoute 50 ml de PEG à 20%/NaCl 2,5 M et le mélange est incubé toute la nuit à 4°C ou sur la glace pendant 30 minutes. Le mélange est secoué fortement en tournant et le surnageant décanté. La bouteille est centrifugée pour obtenir un dépôt de phages précipité sur les parois de la bouteille et le liquide restant est aspiré à la pipette. Le culot est remis en suspension dans 5.0 ml du TE 1x et conservé à 4°C, après quoi 0,5 ml est soumis à une double extraction avec 0,5 ml de TE saturé au phénol. On ajoute à la phase aqueuse 0,05 ml de NaOAc 0,0 M et 1 ml d'éthanol à 95%. Le mélange est placé dans un bain de glace sèche pendant 10 minutes et centrifugé pendant 10 minutes dans une microcentifugeuse à 4°C. Le culot est séché et remis en suspension dans 200 µl de TE 1x. Ce matériel est conservé en aliquote de 0,05 ml à -20°C jusqu'à son utilisation dans la mutagénèse du TNF 26 kd.

Les oligonucléotides suivants sont utilisé pour changer la valine en position 2et/ou 13, l'alanine en position -1 et la proline en position 12. Les oligonucléotides et leurs mutéines correspondantes sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1

1. Mutéines

(a) Délétions

ΔVAL 1
ΔVAL 13
ΔVAL 1 + ΔPRO 12
ΔVAL 1 + ΔVAL 13

(b) Substitutions

(VAL 1 → ALA 1) + (VAL 13 → ALA 13)
(VAL 1 → GLY 1) + (VAL 13 → GLY 13)
(VAL 1 → LEU 1) + (VAL 13 → LEU 13)
(VAL 1 → MET 1) + (VAL 13 → MET 13)
(VAL 1 → PHE 1) + (VAL 13 → PHE 13)
(VAL 1 → HIS 1) + (VAL 13 → HIS 13)
(VAL 1 → THR 1) + (VAL 13 → THR 13)
(ALA 1, VAL 1 → GLN 1, HIS 1) + (PRO 12, VAL 13 → GLN 12, HIS 13)
(ALA 1, VAL 1 → GLN 1, HIS 1) + (PRO 12, VAL 13 → SER 12, THR 13)

2. Oligonucléotides

CP 495 : ΔVAL 1
5'-TCG AGA AGA TGA TCT TGC CTG GGC CAG AGG-3'
CP 496 : crible ΔVAL 1
5'-TGA TCT TGC CTG-3'

CP 497 : ΔPRO 12
5'- TAC AAC ATG GGC TAC CTT GTC ACT CGG GGT -3'
CP 498 : crible ΔPRO 12
5'-GGC TAC CTT GTC-3'

CP 499 : ΔVAL 13
5'-TGC TAC AAC ATG GGC AGG CTT GTC ACT CGG-3'
CP 500 : crible ΔVAL 13
5'-ATG GGC AGG CTT-3'

CP 501 : VAL 1 → ALA 1
5'- TCG AGA AGA TGA TCT AGC TGC CTG GGC CAG AGG-3'
CP 502 : crible VAL 1 → ALA 1
5'-GAT CTA GCT GCC-3'

CP 503 : VAL 13 → ALA 13
5'- TGC TAC AAC ATG GGC AGC AGG CTT GTC ACT CGG-3'
CP 504 : crible VAL 13 → ALA 13
5'-TGG GCA GCA GGC-3'

CP 505 : VAL 1 → GLY 1
5'- TCG AGA AGA TGA TCT ACC TGC CTG GGC CAG AGG-3'
CP 506 : crible VAL 1 → GLY 1
5'-GAT CTA CCT GCC-3'

CP 507 : VAL 13 → GLY 13
5'- TGC TAC AAC ATG GGC ACC AGG CTT GTC ACT CGG-3'
CP 508 : crible VAL 13 → GLY 13
5'-TGG GCA CCA GGC-3'

CP 509 : VAL 1 → LEU 1
5'- TCG AGA AGA TGA TCT CAG TGC CTG GGC CAG AGG-3'
CP 510 : crible VAL 1 → LEU 1
5'-GAT CTC AGT GCC T-3'

CP 511 : VAL 13 → LEU 13
5'- TGC TAC AAC ATG GGC CAG AGG CTT GTC ACT CGG-3'
CP 512 : crible VAL 13 → LEU 13
5'-TGG GCC AGA GGC T-3'

CP 513 : VAL 1 → MET 1
5'- TCG AGA AGA TGA TCT CAT TGC CTG GGC CAG AGG-3'
CP 514 : crible VAL 1 → MET 1
5'-GAT CTC ATT GCC T-3'

CP 515 : VAL 13 → MET 13
5'- TGC TAC AAC ATG GGC CAT AGG CTT GTC ACT CGG-3'
CP 516 : crible VAL 13 → MET 13
5'-TGG GCC ATA GGC T-3'

CP 517 : VAL 1 → PHE 1
5'- TCG AGA AGA TGA TCT AAA TGC CTG GGC CAG AGG-3'
CP 518 : crible VAL 1 → PHE 1
5'-GAT CTA AAT GCC T-3'

CP 519 : VAL 13 → PHE 13
5'- TGC TAC AAC ATG GGC AAA AGG CTT GTC ACT CGG-3'
CP 520 : crible VAL 13 → PHE 13
5'-TGG GCA AAA GGC T-3'

CP 521 : VAL 1 → HIS 1
5'- TCG AGA AGA TGA TCT ATG TGC CTG GGC CAG AGG-3'
CP 522 : crible VAL 1 → HIS 1
5'-GAT CTA TGT GCC T-3'

CP 523 : VAL 13 → HIS 13
5'- TGC TAC AAC ATG GGC ATG AGG CTT GTC ACT CGG-3'
CP 524 : crible VAL 13 → HIS 13
5'-TGG GCA TGA GGC T-3'

CP 525 : VAL 1 → THR 1
5'- TCG AGA AGA TGA TCT AGT TGC CTG GGC CAG AGG-3'
CP 526 : crible VAL 1 → THR 1
5'-GAT CTA GTT GCC T-3'

CP 527 : VAL 13 → THR 13
5'- TGC TAC AAC ATG GGC AGT AGG CTT GTC ACT CGG-3'
CP 528 : crible VAL 13 → THR 13
5'-TGG GCA GTA GGC T-3'

CP 529 : ALA 1, VAL 1 → GLN 1, HIS 1
5'-TCG AGA AGA TGA TCT ATG CTG CTG GGC CAG AGG GCT-3'
CP 530 : crible ALA 1, VAL 1 → GLN 1, HIS 1
5'-TCT ATG CTG CTG-3'

CP 531 : PRO 12, VAL 13 → GLN 12, HIS 13
5'-TGC TAC AAC ATG GGC ATG CTG CTT GTC ACT CGG GGT-3'
CP 532 : crible PRO 12, VAL 13 → GLN 12, HIS 13
5'-GGC ATG CTG CTT-3'

CP 533 : PRO 12, VAL 13 → SER 12, THR 13
5'-TGC TAC AAC ATG GGC AGT GCT CTT GTC ACT CGG GGT-3'
CP 534 : crible PRO 12, VAL 13 → SER 12, THR 13
5'-GGC AGT GCT CTT-3'

Les oligonucléotides sont traités avec une kinase en utilisant les solutions de réaction et les conditions suivantes : 3 μl de tampon KB 10x, 3 λ de rATP 10 mM (dilution 1/10 d'une solution mère de rATP 0.1 M), 2λ d'oligonucléotide mutagène (100 pmole/λ), 21 λ d'H_2O et 1 λ de polynucléotide kinase (10 unités /λ). La réaction se déroule à 37°C pendant 45 minutes et ensuite à 65-68°C pendant 5 minutes. Ensuite, 24 λ d'oligonucléotide traité à la kinase sont dilués dans 56 λ d'H_2O pour donner 2 pmoles/λ.

Le duplex contenant des brèches est formé comme décrit ci-dessous, suivi par un appariement des nucléotides. Les réactifs suivants sont réunis dans un volume total de 40 λ : 8 λ de tampon GDB 5x, 0,5 pmole d'ADNss et 0,1 pmoles d'ADN RF de M13 GAP linéarisé par Hinc II. On prélève 10 λ pour un usage ultérieur et les 30 λ restant sont traités de manière séquentielle comme suit : 3 minutes à 100°C, 5 minutes à 65°C, 30 minutes pour laisserla température redescendre à celle de la pièce, et finalement le mélange est placé sur la glace. Ensuite, 10 λ de duplex contenant des brèches et 10 λ de contrôle (sans brèches) sont soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose pour contrôler la formation du duplex contenant des

brèches. En assumant que le gel montre la présence d'une troisième bande, c'est à dire que le duplex contenant des brèches s'est formé, les oligonucléotides traités à la kinase peuvent être appariés au duplex en mélangeant 16 λ de mélange de réaction du duplex contenant des brèches avec 4 λ d'oligonucléotides traités à la kinase et dilués, et le mélange est chauffé à 65°C pendant 3 minutes puis on laisse redescendre la température à la température de la pièce pendant 20 minutes.

L'hétéroduplex est complété par les réactions d'extension et de ligations appropriées en associant les réactifs suivant dans un volume total de 40 λ : 10λ de duplex contenant des brèches et les amorces, 4λ de tampon PEL 10x, 4λ de dNTPs (solution à 0,25 mM faite à partir de la solution mère à 10 mM), 3λ d'ATP (10λ d'ATP 0,1 M + 1490 λ d'H_2O = 0,662 mM), 17λ d'H_2O, 1λ de Klenow (5u/λ) et 1λ de T4 ADN ligase (0,6 Weiss u/λ, dilué ave du PEL 1x). La réaction se déroule à 16°C pendant deux heures, suivie par une transformation de 200λ de cellules compétentes décongelées HB2154 par 10λ de mélange extension/ligation. Les cellules sont conservées à 0°C pendant 30 minutes et passées à 42°C pendant 1,5 minutes suivie par une mise en culture de différents volumes du mélange de transformation (par exemple, 50λ, 10λ etc.) avec 100λ de culture fraîche de la nuit de cellules HB2151 plus 3.0λ d'agar doux.

Les plaques obtenues sont criblées en utilisant la méthode d'hybridation sur plaque. Bien que de nombreuses méthodes soient connues, une description de la méthode appropriée est faite ci-dessous. Les plaques sont répliquées par copie sur des papiers filtres de nitrocellulose (S&S type BA-85) et l'ADN fixé sur le filtre par une succession de traitement pendant 5 minutes avec du NaOH 0,5 N et du NaCl 1,5 M; NaCl 1M et Tris-HCl (pH 7,4) 0,5 M; et SSC 2x (solution saline de citrate classique). Les filtres sont séchés et passés au four à 80°C pendant 2 heures sous vide.

Les filtres copie sont préhybridés à 55°C pendant 2 heures avec 10 ml par filtre de tampon d'hybridation D'ADN, SSC 5x, pH 7,0, solution de Denhardt (polyvinylpyrrolidone, plus du ficol et de la BSA; 1x 0,002% de chaque), tampon phosphate de sodium à pH 7,0 50 mM, EDTA 0,5 mM, SDS à 1% et ARN de levure 100 μg/ml. Le tampon de préhybridation est éliminé et les échantillons hybridés avec la sonde traitée par une kinase appropriée, c'est à dire les oligonucléotides traités par une kinase cités précédemment, dans des conditions qui dépendent de la *stringence* désirée. Environ 2 x 10^6 cpm/ml total sont utilisés. Les conditions typiques de stringence modérée sont une température de 42°C plus du formamide à 50% pendant 24-36 heures en employant un volume de 1-5 ml/filtre de tampon d'hybridation d'ADN contenant la sonde. Pour une plus forte stringence, des températures et des temps d'incubation plus courts sont employées. Les conditions appropriées d'hybridation consistent à hybrider les sondes aux filtres dans du SSC 5x, de la solution Denhardt, $NaPO_4$ 50 mM, pH 7,0, EDTA 5 mM, SDS à 1% et 100 mg/ml d'ARN de levure à 10° sous la T_M de l'oligonucléotide utilisé pour faire le criblage. Ensuite les filtres sont lavés deux fois, 30 minutes pour chaque lavage, à la température de la pièce avec du SSC 2x, SDS à 0,1%, et lavés encore une fois avec du SSC 2x, SDS à 1% à 5° sous la

T_M de l'oligonucléotide utilisé pour cribler, puis les filtres sont séchés. Enfin, les filtres sont autoradiographiés à -70°C pendant 36 heures. L'autoradiographie met en évidence les plaques contenant le virus qui porte les mutéines d'intérêt.

En plus de produire des mutéines dans lesquelles la valine en position 2 et/ou 13 ont été délétée ou substituée, des mutéines possédant de grandes délétions peuvent être produites, délétion qui englobent les deux sites de clivage prédominant du TNF 26 kd. Un mode de réalisation privilégié de mutéines est de créer une délétion des acides aminés de -9 à +14 comme cela est présenté à la Figure 1. Cette mutéine a été construite en utilisant les matériel et méthodes décrits plus haut et l'oligonucléotide CP375 qui a la séquence suivante :

5'-GTTTGCTACAACATGGAGGTCCCTGGGGGA-3'

C. Inhibiteurs protéine/peptide

Les peptides ayant les séquences suivantes en acides aminés sont synthétisées en utilisant la méthode en phase solide décrite en détail par Merrifiels, R.B. (1985) dans Science, 232:341-347:

Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser;
Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala;
Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-His-Val-Val-Ala;
Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-His-Val-Val-Ala;
Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro.

On utilise un appareil de synthèse automatique de peptide Biosearch 9500 en clivant avec du fluorure d'hydrogène, et une purification préparative par HPLC en utilisant l'appareil Waters Delta Prep 3000 avec une colonne de 15-20 μm Vydac C4 PrepPAK.

On montre que ces peptides inhibent l'activité convertase en réalisant le test décrit plus haut en présence de quantités différentes de chaque peptide. L'électrophorèse sur gel et le Western Blot du mélange de réaction montrent une inhibition de la conversion du TNF 26 kd en TNF 17 kd.

Exemple 4

Effet protecteur des inhibiteurs de convertase dans le traitement des septicémies.

On a montré comme suit que des composés qui sont des inhibiteurs fonctionnels de l'activité de la convertase sont capables de prévenir la septicémie sur un modèle animal, le babouin. Un anticorps anticonvertase, humain, murin ou recombinant, à une concentration de 5 mg/kg est administré par une simple I.V., 60 minutes avant que l'animal ait reçu une dose létale d'E. coli, et 2 mg/ml simultanément avec la charge d'E. coli. L'anticorps est administré dans une

solution saline physiologique et environ 4 X 10^{10} bactéries E. coli sont utilisés. La dose d'E. coli est administrée par perfusion sur une période de 2 heures. Les animaux qui ont reçu l'anticorps sont protégés pour au moins 7 jours tandis que les animaux qui ont reçu seulement la solution saline meurent dans les 16 à 32 heures.

Une protection similaire est attribuable aux inhibiteurs de convertase de type mutéine du TNF comme cela est montré dans l'Exemple 3. Les mutéines sont administrées à une concentration de 5 mg/kg par une simple I.V. 60 minutes avant que l'animal ait reçu une dose de 4 x 10^{10} de bactéries E. coli. Les babouins reçoivent aussi 2 mg/kg de mutéines simultanément avec la charge bactérienne.

Enfin, les peptides présentés dans l'Exemple 3, à savoir Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser et Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala ont été testé comme cela est décrit ci-dessus et produisent des effets protecteurs similaires.

La présente invention a été décrite en faisant référence à des modes de réalisations spécifiques. Cependant, cette demande couvre également les changements et substitutions qui peuvent être faites par des hommes du métier sans se départir de l'esprit et de la portée des revendications suivantes.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'identification d'agents prophylactiques ou thérapeutiques de maladies causées par une hormone protéique mature, ou par une ou plusieurs espèces de plus faible poids moléculaire de ladite hormone protéique mature, qui sont produits à partir d'une prohormone par clivage par une convertase de ladite prohormone comprenant les étapes consistant à :

a) mettre en contact la dite prohormone avec une quantité efficace de ladite convertase;

b) mesurer la conversion de ladite prohormone en ladite hormone mature ou en une ou plusieurs espèce de plus faible poids moléculaire de ladite hormone mature;

c) répéter les étapes "a" et "b" décrites ci-dessus, et en outre inclure une molécule identifiée en principe comme un agent prophylactique ou thérapeutique des maladies causées par ladite hormone mature;

d) mesurer la conversion de ladite prohormone en ladite hormone mature ou en des espèces de plus faible poids moléculaire de ladite hormone mature; et

e) comparer la quantité de conversion de ladite prohormone dans des étapes "b" et "d".

2. Agent thérapeutique ou prophylactique pour le traitement de maladies causées par une hormone protéique

mature et identifié par le procédé selon la revendication 1.

3. Agent thérapeutique ou prophylactique pour le traitement de maladies causées par une hormone protéique mature qui est produite à partir d'une prohormone par clivage par une convertase, ledit agent thérapeutique ou prophylactique ayant la propriété d'inhiber ou de prévenir la production de ladite hormone mature par ladite convertase en entrant en compétition avec ladite convertase pour la liaison à ladite prohormone.

4. Procédé d'identification d'agents prophylactiques ou thérapeutiques de la septicémie, comprenant les étapes consistant à :

a) mettre en contact du TNF de poids moléculaire d'environ 26 000 avec une quantité efficace de convertase du TNF, éventuellement ledit TNF et ladite convertase du TNF étant dans une solution dont le pH est d'environ 7.0 et/ou ladite convertase du TNF étant obtenue à partir de cellules HL60;

b) mesurer la conversion du TNF de poids moléculaire d'environ 26 000 en une ou plusieurs espèces de TNF de plus faible poids moléculaire, où éventuellement lesdites une ou plusieurs espèces de TNF de plus faible poids moléculaire ont des poids moléculaires choisis parmi ceux d'environ 17 000 et 15 000;

c) répéter les étapes "a" et "b" décrites ci-dessus, et en outre inclure une molécule identifiée en principe comme un agent prophylactique ou thérapeutique des septicémies; et

d) mesurer l'inhibition de ladite conversion dudit TNF de poids moléculaire d'environ 26 000 en une ou plusieurs

espèces de TNF de plus faible poids moléculaire.

5. Procédé selon la revendication 4 dans lequel mesurer l'inhibition de ladite convertase comprend les étapes consistant à :

a) marquer ledit TNF de poids moléculaire d'environ 26 000 avec un marqueur adéquat, où éventuellement ledit marqueur est choisi parmi un groupe constitué de radionucléides, de fluors, ou d'enzymes;
b) traiter ledit TNF de 26 kd marqué avec ladite convertase afin de convertir ledit TNF de 26 kd en ledit TNF de poids moléculaire d'environ 17 000;
c) séparer, éventuellement par électrophorèse, ledit TNF de poids moléculaire d'environ 26 000 dudit TNF de poids moléculaire 17 000; et
d) mesurer ledit marqueur présent dans ledit TNF de poids moléculaire 17 000 ou mesurer la réduction dudit marqueur dans les espèces de 26 kd.

6. Agent prophylactique ou thérapeutique de la septicémie qui inhibe la convertase du TNF, la caractéristique de ladite convertase étant de convertir le TNF de 26 kd en une ou plusieurs espèces de TNF de plus faible poids moléculaire.

7. Agent prophylactique ou thérapeutique selon la revendication 6, où ledit agent prophylactique ou thérapeutique comprend un anticorps anti-convertase; ou comprend des mutéines non hydrolysables de TNF de poids moléculaire d'environ 26 000, où éventuellement lesdites mutéines ont une substitution ou une délétion sur la valine en position 2 et/ou une substitution ou une délétion sur la valine en position 13; ou comprend un peptide ou une protéine ayant une séquence en acides aminés en grande partie similaire à la séquence en acides aminés présente sur ledit TNF de 26 kd à laquelle ladite

convertase se lie.

8. Agent prophylactique ou thérapeutique selon la revendication 7, dans lequel lesdites mutéines comprennent une mutéine ayant une délétion des acides aminés allant de 9 à 14 du TNF de 26 kd.

9. Agent prophylactique ou thérapeutique selon la revendication 6 qui comprend un peptide qui entre en compétition pour la liaison de la convertase du TNF avec ledit TNF de 26 kd et comprend la structure X-Ala-Val-Y dans laquelle X et Y sont des acides aminés.

10. Agent prophylactique ou thérapeutique selon la revendication 6 comprenant un peptide ou une protéine ayant une séquence d'acides aminés choisis parmi le groupe constitué de Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser, Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala, Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-His-Val-Val-Ala, Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-His-Val-Val-Ala, et Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro.

11. Anticorps anti convertase du TNF, éventuellement anticorps recombinant, où ledit anticorps est capable de se lier à ladite convertase et également de neutraliser l'activité enzymatique de ladite convertase ou de prévenir la liaison de ladite convertase au TNF, ladite convertase étant caractérisée par sa capacité à convertir du TNF de poids moléculaire d'environ 26 kd en une ou plusieurs espèces de TNF de plus faible poids moléculaire, éventuellement lesdites espèces de TNF de plus faible poids moléculaire ayant un poids moléculaire d'environ 17 000.

12. Anticorps selon la revendication 11 où l'anticorps est un anticorps murin ou humain.

13. Utilisation d'un inhibiteur de la convertase du TNF, ladite convertase étant caractérisée par sa capacité à convertir du TNF de poids moléculaire d'environ 26 kd en une ou plusieurs espèces de TNF de plus faible poids moléculaire, éventuellement lesdites espèces de TNF de plus faible poids moléculaire ayant un poids moléculaire d'environ 17 000, dans la production d'un médicament pour la prophylaxie ou la thérapie de la septicémie.

14. Utilisation selon la revendication 13, où ledit inhibiteur comprend un anticorps anti-convertase ou des mutéines de TNF non hydrolysables, éventuellement des mutéines présentées dans le Tableau I.

15. Utilisation selon la revendication 14, où ledit inhibiteur comprend des mutéines ayant une substitution ou une délétion sur la valine en position 2 et/ou une substitution ou une délétion sur la valine en position 13, ou comprend une mutéine ayant une délétion des acides aminés 9 jusqu'à 14 du TNF de 26 kd.

16. Utilisation selon la revendication 13, où ledit inhibiteur comprend un peptide ou une protéine qui entre en compétition avec le TNF de 26 kd pour la liaison à la convertase.

17. Utilisation d'un inhibiteur de la convertase du TNF dans la fabrication d'un médicament pour traiter des pateints atteints du SIDA ou pour traiter des patients atteints d'une maladie autoimmune, éventuellement l'arthrite.

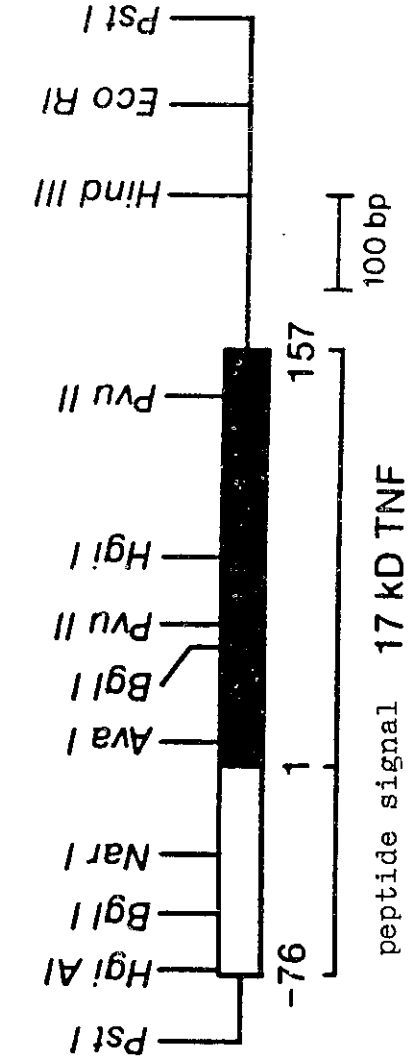
Pst I
Hgi AI
Bgl I
Nar I
Ava I
Bgl I
Pvu II
Hgi I
Pvu II
Hind III
Eco RI
Pst I
-76
1
157
peptide signal
17 kD TNF
100 bp

FIG. 1 A.

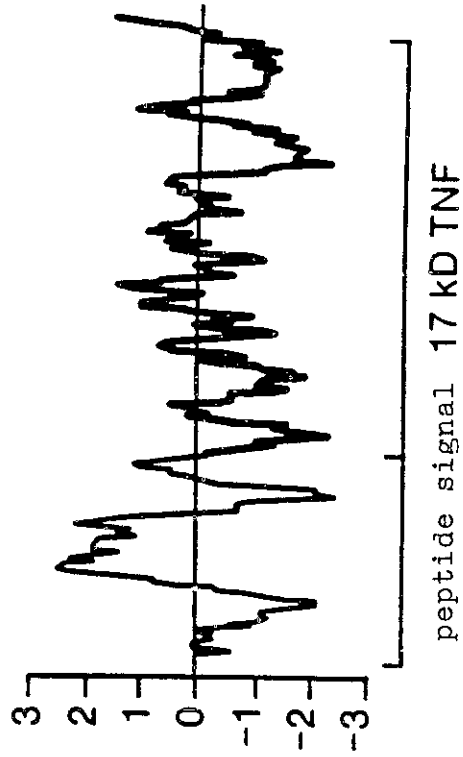
3
2
1
0
-1
-2
-3
Hydrophobie
peptide signal
17 kD TNF

FIG. 1 B.

-76

```
ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC CGG GAC GTG GAG CTG
Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu

GCC GAG GAG GCG CTC CCC AAG AAG ACA GGG GGG CCC
Ala Glu Glu Ala Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro

CAG GGC TCC AGG CGG TGC TTG TTC CTC AGC CTC TTC
Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe Lue Ser Leu Phe

TCC TTC CTG ATC GTG GCA GGC GCC ACC ACG CTC TTC
Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe

TGC CTG CTG CAC TTT GGA GTG ATC GGC CCC CAG AGG
Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg

GAA GAG TCC CCC AGG GAC CTC TCT CTA ATC AGC CCT
Glu Glu Ser Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro

CTG GCC CAG GCA▼GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG
Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro

AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT
Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro

CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG
Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg

GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg

GAT AAC CAG CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC
Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr

CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC TTC AAG GGC CAA GGC
Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly

TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC ATC
Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile

AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn

CTC CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG
Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu

ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC AAG CCC TGG TAT GAG
Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu

CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG AAG
Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys

GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp

TAT CTC GAC TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT
Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe

                157
GGG ATC ATT GCC CTG
Gly Ile Ile Ala Leu
```

FIG. 1C

FIG. 2

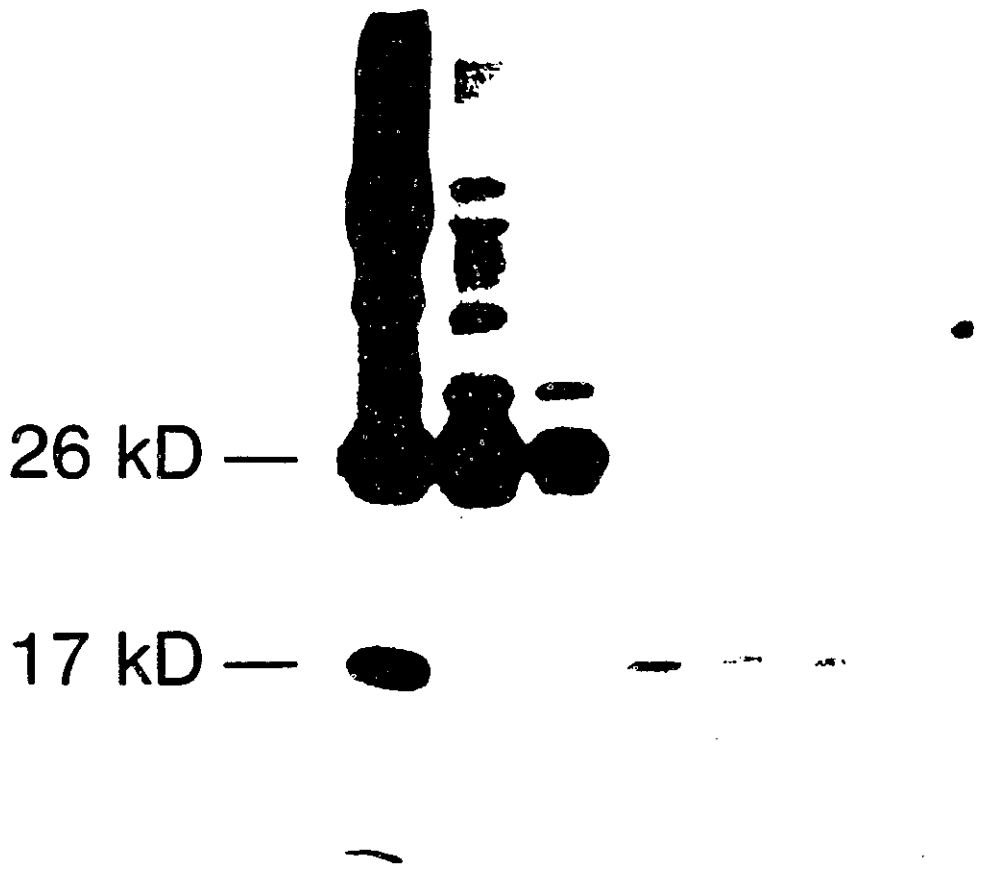

FIG. 3A

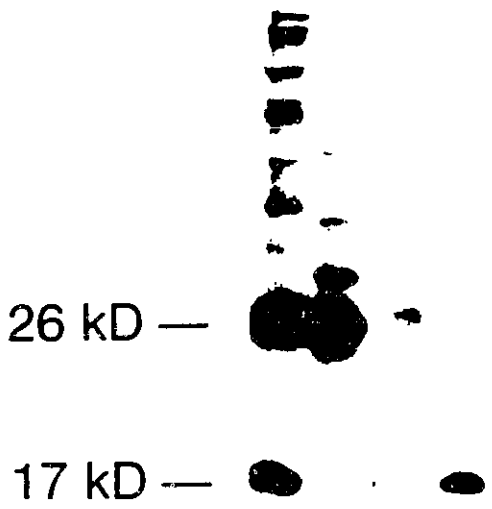

FIG. 3B